

Communication

Essai de vaccination des poussins EOPS contre la maladie de Newcastle par la méthode des grains de mil enrobés d'une variante thermotolérante du virus LaSota

Nguyen-Ba-Vy¹

NGUYEN-BA-VY. Essai de vaccination des poussins EOPS contre la maladie de Newcastle par la méthode des grains de mil enrobés d'une variante thermotolérante du virus LaSota. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1994, 47 (4) : 357-360

La variante thermotolérante A_{300} du virus LaSota a été utilisée pour vacciner des poussins exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) de 4 semaines, au moyen des grains de mil enrobés de virus. Il y avait formation d'anticorps IHA avec des doses de vaccin supérieures à $10^{6.2} \text{DIO}_{50}$ /poussin (dose infectant 50 p. 100 des œufs) et aussi une résistance à l'épreuve 2 mois après la vaccination, alors que la mortalité des témoins était de 100 p. 100. La DP_{50} (dose protectrice 50 p. 100) est estimée à $10^{6.85} \text{DIO}_{50}$. Ce vaccin lyophilisé, destiné aux petits élevages "de famille" des villageois africains, a pu être conservé à la température ambiante, jusqu'à 35°C, pendant au moins 1 semaine. D'autres expérimentations sur une plus grande échelle sont encore nécessaires pour déterminer le potentiel de ce vaccin dans les conditions naturelles du milieu rural africain.

Mots clés : Volaille - Poussin - Maladie de Newcastle - Vaccin - Virus LaSota - Aptitude à la conservation - Anticorps - France.

Introduction

En Afrique, la lutte contre la maladie de Newcastle est presque inexistante dans les petits élevages villageois en raison des problèmes d'ordre socio-économique et des difficultés techniques comme le besoin d'une chaîne de froid pour la conservation du vaccin. Il fallait donc trouver un vaccin thermotolérant et un mode d'administration simple à la portée des éleveurs. C'est dans ce cadre qu'a été examiné le potentiel de plusieurs vaccins comme le V_4 qui a déjà fait l'objet de nombreuses études (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11), ou le A_{300} fabriqué à partir d'une variante thermotolérante du virus LaSota. Le pouvoir immunogène du vaccin LaSota et ses différents modes d'emploi (eau de boisson, goutte oculaire, aérosol,...) sont connus et bien étudiés (11, 12, 13). Ce travail n'avait pas pour but de réexaminer ces propriétés, mais de déterminer d'une part si ce vaccin pouvait être administré aux volailles par la méthode originale des grains de mil enrobés de ce virus, et d'autre part s'il était possible de le conserver à la température ambiante. Les résultats préliminaires sont exposés dans cet article.

1. Laboratoire PATHOTROP, CIRAD-EMVT, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France.

Reçu le 2.2.1995, accepté le 7.3.1995

Matériel et méthodes

Souches de virus de la maladie de Newcastle

Souche vaccinale A_{300}

Une variante thermotolérante de la souche de virus lentogène LaSota a été sélectionnée parmi les lots de virus qui ont résisté à des traitements thermiques à 45°C : le dérivé A_{300} est sorti vivant après 300 jours de conservation, sous forme lyophilisée, à 45°C.

Souche virulente Hertz 33/56

La souche Hertz 33/56 est l'une des souches vélogènes de référence utilisables pour les épreuves après vaccination. Elle a été injectée par la voie intramusculaire aux volailles vaccinées et aux témoins, à la dose de $10^{5.2} \text{DIO}_{50}$ (dose infectant 50 p. 100 des œufs embryonnés).

Fabrication du vaccin

Le liquide allantoïdien des œufs embryonnés de poules exemptes d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS), inoculés avec du virus A_{300} est récolté après 4 jours d'incubation à 37°C puis mélangé à égal volume avec le stabilisateur HLS (solution d'hydrolysate de lactalbumine à 10 p. 100 et de saccharose à 5 p. 100). Chaque flacon contenant 5 ml de vaccin est lyophilisé puis bouché sous vide. La reconstitution du produit est effectuée avec du sérum physiologique.

Titrages des virus et des anticorps

La méthode de titrage des virus sur des œufs embryonnés EOPS de 9 jours a été exposée (7). Le titre viral est calculé selon la méthode de Reed-Muench (8). La réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) est effectuée selon la microméthode du Laboratoire central de Recherches avicole et porcine à Ploufragan (CNEVA, France), sur des plaques à 96 cupules, en utilisant 4 unités d'antigène HA (25 µl) pour chaque dilution (25 µl) du sérum à examiner et 25 µl d'une suspension de globules rouges de coq à $80 \times 10^6/\text{ml}$.

Exposition des flacons de vaccins à différentes températures

Quatre lots du vaccin A_{300} lyophilisé ont été incubés dans des étuves respectivement à 37°C et à 45°C. A chaque période, 3 flacons de chaque lot sont titrés séparément sur des œufs embryonnés EOPS ; le titre moyen est la moyenne géométrique de ceux-ci.

Communication

Technique de vaccination des poussins par la méthode originale des grains de mil enrobés de virus

Le contenu de chaque flacon de vaccin lyophilisé est reconstitué avec 5 ml de sérum physiologique. La suspension virale, une fois devenue limpide, est mélangée avec une solution de lait écrémé à 0,25 p. 100 pour avoir un volume final de 30 ml (volume du flacon). Cette préparation est employée pour mouiller soigneusement 100 g de mil blanc. Ces grains-vaccin sont étalés en une traînée de 1 m de long environ sur une planche en bois, avant d'être offerts à un lot de 10 poussins, afin que chacun y ait accès. Ces volailles doivent être soumises la veille à une diète hydrique pour que les grains-vaccin soient ingérés dans le plus bref délai. La dose de virus varie selon l'expérience et la quantité distribuée est ajustée selon le nombre de poussins utilisés.

Détermination de la dose protectrice du vaccin A₃₀₀

Trois essais de vaccination suivie d'une épreuve virulente ont été réalisés, chacun comportant un lot de 4 témoins. Différentes doses du vaccin A₃₀₀, allant de 10⁵ à 10^{7,9} DIO ont été administrées à des lots de 4 poussins Leghorn EOPS de 4 semaines. Un lot a reçu 2 distributions de grains-vaccin à 1 semaine d'intervalle. Le taux des anticorps IHA a été examiné sur des sérums prélevés un jour avant la vaccination puis aux 21e, 35e jours et enfin à la veille de l'épreuve avec la souche virulente Hertz 33/56. Les lots témoins ont été soumis aux mêmes examens sérologiques.

Résultats**Examen de l'innocuité du vaccin A₃₀₀**

Le vaccin A₃₀₀ a été administré à 24 poussins EOPS de 4 semaines par la méthode originale décrite plus haut avec différentes doses de virus allant de 10⁵ DIO₅₀/poussin jusqu'à 10^{7,9}. Quatre d'entre eux ont reçu 2 fois à 1 semaine d'intervalle, la dose de 10^{7,9} DIO₅₀/poussin. Aucune morbidité ou mortalité n'a été constatée durant 1 mois d'observation. Le vaccin A₃₀₀ n'est donc pas pathogène pour les poussins de 4 semaines élevés dans un environnement sain.

Examen du pouvoir immunogène du vaccin A₃₀₀*Premier essai*

Le vaccin A₃₀₀ a été administré selon la même technique à la dose de 10^{7,9} DIO₅₀/poussin, 1 fois à 4 poussins de 4 semaines et 2 fois à 1 semaine d'intervalle à 4 autres. Ils ont tous résisté à l'épreuve au 58e jour avec la souche virulente Hertz 33/56. Il y avait production des anticorps IHA : chez les sujets recevant une seule fois les grains-vaccin, les titres géométriques moyens en log₁₀ étaient respectivement de 2,12 au 21e jour, 2,05 au 35e jour, 2,2

au 56e jour après la vaccination et 3,73 au bout de 10 jours après l'épreuve (fig. 1). Ceux qui ont reçu 2 fois ce vaccin à 1 semaine d'intervalle, ont montré des titres moyens de 2,05 au 21e jour, 1,9 aux 35e et 56e jours et 3,47 après l'épreuve. Les 4 témoins ayant gardé des taux toujours inférieurs à 0,69 ont tous succombé à l'épreuve.

Deuxième essai

Deux lots de 4 poussins, vaccinés respectivement avec 10⁵ et 10⁶ DIO₅₀ du virus A₃₀₀, n'ont révélé que des titres (en log₁₀) égaux ou inférieurs à 0,69 jusqu'au jour de l'épreuve, à laquelle aucun n'a résisté ainsi que les 4 témoins.

Troisième essai

Un lot de 4 poussins vaccinés avec 10^{6,8} DIO₅₀ a perdu lors de l'épreuve les 2 sujets dont le taux est resté égal ou inférieur à 1. Les 2 autres avec des titres moyens de 1,75 aux 21e et 56e jours après la vaccination ont bien résisté au virus Hertz 33/56 (fig. 2).

Dans un deuxième lot de 4 poussins vaccinés avec 10⁷ DIO₅₀, 3 poussins ont résisté à l'épreuve ; ils ont eu des titres moyens de 1,90 au 21e jour, 1,60 au 35e jour et 1,50 au 56e jour après la vaccination. Le 4e sujet, avec un titre égal à 0,69, a succombé à l'épreuve ainsi que les 4 témoins.

Détermination de la DP₅₀ (dose protectrice à 50 p. 100) du vaccin A₃₀₀

Les résultats préliminaires obtenus au cours de ces 3 essais avec différentes doses de virus A₃₀₀ ont permis le calcul des pourcentages des sujets immunisés selon la méthode des totaux cumulatifs. Une dose inférieure ou égale à 10⁶ DIO₅₀ semble insuffisante pour conférer une résistance à l'épreuve, tandis qu'une protection à 100 p. 100 a été acquise avec la dose de 10^{7,9}, à 83 p. 100 avec 10⁷ et à 40 p. 100 avec 10^{6,8} DIO₅₀. La valeur de la DP₅₀ a été estimée à 10^{6,85} DIO₅₀. Ces résultats n'ont encore qu'une valeur indicative, en raison du faible nombre de poussins utilisés dans chaque lot, et d'autres expériences, sur un plus grand nombre de sujets, sont encore nécessaires pour obtenir des données significatives sur le plan statistique.

Thermotolérance du vaccin A₃₀₀

Un premier lot de vaccin A₃₀₀ lyophilisé conservé à 4°C a gardé un titre moyen de 10^{9,5} DIO₅₀/flacon (dose infectant 50 p. 100 des oeufs). Une incubation à 45°C l'a fait chuter à 10^{7,8} au bout de 7 jours, à 10⁷ après 14 jours et à 10^{6,8} au 31e jour (fig. 3, tabl. I). Les flacons conservés à 35°C ont eu moins de pertes en montrant des titres moyens de 10^{8,7} DIO₅₀ au bout de 42 heures, de 10^{8,5} au 6e jour et de 10^{8,4} au 12e jour.

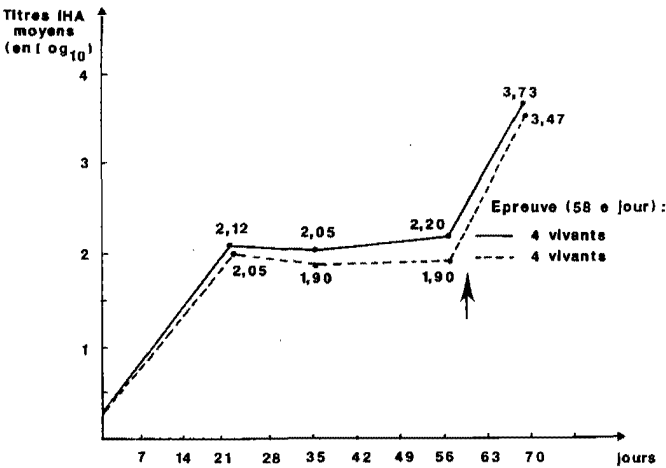


Figure 1 : Cinétique des anticorps IHA chez les poussins vaccinés 1 fois (—) et 2 fois (---) avec $10^{7.9}DIO_{50}$ du vaccin A_{300}

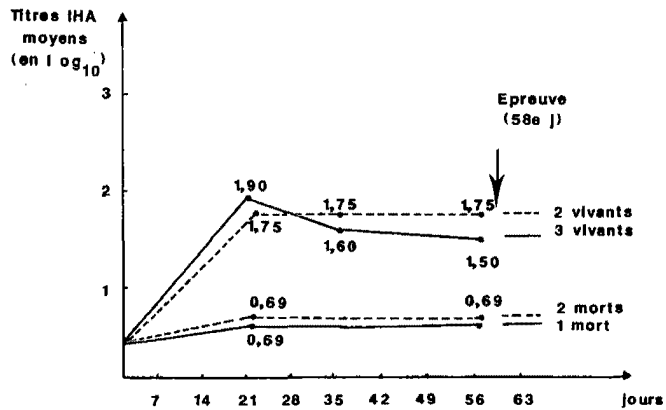


Figure 2 : Cinétique des anticorps IHA chez les poussins vaccinés avec $10^{6.8}DIO_{50}$ (---) et $10^7 DIO_{50}$ (—) du vaccin A_{300}

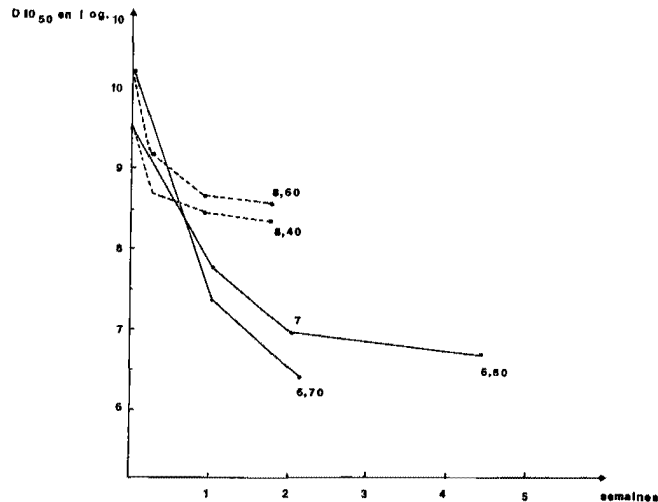


Figure 3 : Thermotolérance du vaccin A_{300} à $35^{\circ}C$ (---) et à $45^{\circ}C$ (—).

TABLEAU I Titres moyens (en \log_{10}) du vaccin A_{300} lyophilisé et conservé à différentes températures.

	Durée	Température de conservation		
		4 °C	35 °C	45 °C
Premier essai	42 h	9,5	8,7	7,8
	6 j		8,5	
	7 j		8,4	
	12 j			
	14 j	7		
31 j	9,5		6,8	
Deuxième essai	42 h	10,2	9,2	7,4
	6 j		8,7	
	7 j	8,6		
	12 j			
	15 j	10,2	6,7	

Le titre moyen d'un 2e lot de vaccin lyophilisé et conservé à $4^{\circ}C$ était de $10^{10.2}DIO_{50}$ /flacon. Un séjour à $45^{\circ}C$ l'a abaissé à $10^{7.4}$ au bout de 7 jours et à $10^{6.7}$ au 15e jour. L'inactivation était relativement plus lente à $35^{\circ}C$: les flacons ont conservé un titre moyen de $10^{9.2}$ au bout de 42 heures, de $10^{8.7}$ après 6 jours et de $10^{8.6}$ au 12e jour.

Discussion

Le virus LaSota possède, non seulement un pouvoir immunogène plus élevé que les autres souches lentogènes HB_1 , F ou V_4 (11, 12, 13) même sur des poussins pourvus d'anticorps d'origine maternelle, mais il détient aussi un avantage sur les vaccins inactivés. En effet, ces derniers, tout en suscitant la formation des anticorps IHA et neutralisants, n'empêchent pas une infection ultérieure de la voie trachéale par une souche virulente, d'où l'existence possible des porteurs de virus parmi ces sujets vaccinés. En revanche, les volailles bien immunisées avec le LaSota hébergent rarement du virus virulent (13).

Le vaccin A_{300} est non seulement immunogène mais aussi thermotolérant : après une dizaine de jours d'exposition à des températures allant jusqu'à $35^{\circ}C$, le contenu lyophilisé de chaque flacon renferme encore suffisamment de doses de virus vivant pour immuniser 10 à 30 poulets. Ce nombre correspond bien à l'effectif moyen des petits élevages de "famille" des villageois africains.

Un vaccin vivant, s'il ne crée que des effets secondaires négligeables sur des volailles maintenues dans un milieu sain, peut favoriser l'apparition d'infections opportunistes sur des oiseaux élevés dans un environnement hostile où différents agents peuvent devenir pathogènes suite au stress vaccinal et à une immunodépression transitoire. Dans les pays tropicaux, il est conseillé de faire accompagner chaque vaccination par une antibioprévention, notamment pour les races de volailles réputées fragiles.

Communication

Conclusion

Ces essais de vaccination des poussins EOPS âgés de 4 semaines par la méthode des grains de mil enrobés d'une variante thermotolérante (A_{300}) du virus LaSota ont mis en évidence la faisabilité de cette technique en même temps que l'innocuité et le pouvoir immunogène de ces vaccins : des doses de $10^{7.9} \text{DIO}_{50}/\text{poussin}$, même à 2 reprises, n'ont causé apparemment aucun effet nuisible aux volailles maintenues dans un milieu sain. La formation des anticorps IHA et l'immunité ont été conférées par des doses de virus supérieures à 10^6DIO_{50} ; la DP_{50} est estimée à $10^{6.85} \text{DIO}_{50}/\text{poussin}$. Ce vaccin lyophilisé se conserve au moins pendant 1 semaine à la température ambiante jusqu'à 35°C .

Bibliographie

1. AINI (I.), IBRAHIM (A.L.), SPRADBROWN (P.B.). Vaccination of chicken against Newcastle disease with a food pellet vaccine. *Avian Path.*, 1990, **19**: 371-384.
 2. AINI (I.), IBRAHIM (A.L.). Field trials of a food-based vaccine to protect village chickens against Newcastle disease. *Res. vet. Sci.*, 1990, **49**: 216-219.
 3. BELL (I.G.), NICHOLLS (P.J.), NORMAN (C.), COOPER (K.), CROSS (G.M.). The serological responses of chickens to mass vaccination with a live V_4 Newcastle disease virus vaccine in the field and in the laboratory. 1. Meat chickens. 2. Layer pullets. *Aust. vet. J.*, 1991, **68** (3): 85-89 ; 90-92.
 4. FONTANILLA (B.C.), SILVANO (F.), CUMMING (R.). Oral vaccination against Newcastle disease of village chickens in the Philippines. *Prev. vet. Med.*, 1991, **10**: 273-283.
 5. JAGNE (J.), AINI (I.), SCHAT (K.A.), FENNEL (A.), TOURAY (O.). Vaccination of village chickens in the Gambia against Newcastle disease using the heat-resistant food-pelleted V_4 vaccine. *Avian Path.*, 1991, **20**: 721-724.
 6. JAYAWARDANE (G.W.L.), DE ALWIS (M.C.L.), BANDARA (D.). Oral vaccination of chickens against Newcastle disease with V_4 vaccine delivered on processed rice grains. *Aust. vet. J.*, 1990, **67**: 364-366.
 7. NGUYEN-BA-VY. Evaluation de la thermotolérance du vaccin V_4 lyophilisé contre la maladie de Newcastle. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1992, **45** (3-4) : 235-240.
 8. REED (I.J.), MUENCH (H.). A simple method for estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, 1938, **27**: 493-497.
 9. SAGILD (I.K.), HARENAPE (J.M.). The status of Newcastle disease and the use of V_4 vaccine in Malawi. *Avian Path.*, 1987, **16**: 165-176.
 10. TANTASWADI (V.), DANVIVATANAPORN (J.), SIRIWAN (P.), CHAISINGH (A.), SPRADBROW (P.B.). Evaluation of an oral Newcastle disease vaccine in Thailand. *Prev. vet. Med.*, 1992, **12**: 87-94.
 11. WESTBURY (H.A.). Comparison of the immunogenicity of Newcastle disease virus strains V_4 , B_1 and LaSota in chickens. 1. Tests in susceptible chickens. 2. Tests in chickens with maternal antibody to the virus. *Aust. vet. J.*, 1984, **61** (1): 5-9 ; 10-13.
 12. WINTERFIELD (R.W.), GOLDMAN (C.L.), SEADALE (E.H.). Newcastle disease immunization studies. 4. Vaccination of chickens with B_1 , F and LaSota strains of Newcastle disease virus administered through the drinking water. *Poult. Sci.*, 1957, **36**: 1076-1088.
 13. WINTERFIELD (R.W.), DHILLON (A.S.), ALBY (L.J.). Vaccination of chickens against Newcastle disease with live and inactivated Newcastle disease virus. *Poult. Sci.*, 1980, **59**: 240-246.
- NGUYEN-BA-VY.** Vaccination trial of SPF chickens against the Newcastle disease using the original technique of a coated-millet vaccine from a thermotolerant derivative of the LaSota virus. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1994, **47** (4) :357-360

The thermotolerant variant A_{300} of LaSota virus was used to vaccinate 4 week old specified pathogen-free (SPF) chickens by feeding them with virus coated-millet. With vaccine doses above $10^6 \text{EID}_{50}/\text{bird}$, HI antibodies developed and protection to challenge was seen 2 months after vaccination, while 100 % mortality occurred in the control groups. The PD_{50} was estimated to $10^{6.85} \text{EID}_{50}$. This lyophilized vaccine intended for African village chickens can be kept at ambient temperature for at least 1 week up to 35°C . Other trials on a large scale are still needed to determine the potential of this vaccine in the field conditions of rural Africa.

Key words : Poultry - Chick - Newcastle disease - Vaccine - LaSota virus - Antibody - France.